

ELEKTROPHORETISCHE FREISETZUNG VON SUBSTANZEN AUS MIKROPIPETTEN

Günther Sothmann

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0072

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE
(DEUTSCHE FORSCHUNGSANSTALT FÜR PSYCHIATRIE)

ELEKTROPHORETISCHE FREISETZUNG VON SUBSTANZEN AUS MIKRO-
PIPETTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Günther S o t h m a n n

aus Hilpoltstein

München, 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
M ü n c h e n

Referent: Prof. Dr. A. Herz

Co-Referent: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.1973



MEINEN ELTERN

ELEKTROPHORETISCHE FREISETZUNG VON SUBSTANZEN AUS MIKRO-
PIPETTEN

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

II METHODIK

A) Substanzen

B) Elektroden

1. Mehrfachelektroden

2. Einzelelektroden

C) Allgemeine Methodik

III. ERGEBNISSE

I. Tertiäre Amine und quarternäre Ammoniumbasen

1. Alterungseffekt

2. Spontanfreisetzung

3. Haltestrom

4. Gegenstrom

5. Ohm-sche Widerstände der Phoresekanälchen

6. Streuung der Freisetzungsraten

II. Aminosäuren

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Die mikroelektrophoretische Methodik gewinnt heute zunehmend an Bedeutung für mikropharmakologische Untersuchungen von möglichen Überträgersubstanzen. Mit Hilfe des elektrischen Stromes werden hierbei pharmakologisch wirksame Substanzen in unmittelbare Nachbarschaft einzelner Nervenzellen transportiert. So kann man unter Umgehung der Blut-Gehirn-Schranke Substanzen auf ihre Wirkung an Nervenzellen untersuchen. Durch gleichzeitige Ableitung der Aktionspotentiale und anderer elektrophysiologischer Parameter wie exzitatorischer und inhibitorischer postsynaptischer Potentiale, Membranwiderstand, Leitfähigkeitsänderungen, elektrische Erregbarkeit und durch die Bestimmung von Equilibriumpotentialen kann Auskunft darüber gewonnen werden, ob eine fragliche Substanz als Überträgerstoff im Zentralnervensystem in Frage kommt. Durch gleichzeitige Applikation von zwei Substanzen können Interaktionen von Agonist und Antagonist direkt auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Der großen Anzahl von Untersuchungen, in denen diese Methodik in vivo verwendet wurde (PHILLIS, 1970; STEINER, 1971), stehen relativ wenige Untersuchungen gegenüber, die sich mit der Freisetzung der jeweils verwendeten Substanzen aus den Elektroden beschäftigen. Die tatsächliche Freisetzungsrates aus solchen Mikropipetten ist verständlicherweise von außerordentlicher Bedeutung.

Theoretisch ist die elektrophoretische Freisetzung durch das FARADAY'sche Gesetz beschrieben:

$$m = \frac{M \cdot e \cdot A \cdot \text{sec}}{F} \quad (\text{g})$$

M = Molekulargewicht

e = elektrische Wertigkeit des transportierten Ions

A-sec = transportierte Strommenge

F = Faraday'sche Konstante = 96489 Coulombs (C)

Aus physikalischen Meßwerten, wie Molekülgröße, Hydratationshülle, Ionisationsgrad und Molarität der Lösung kann ein Näherungswert für die Freisetzung vorausberechnet werden. Diese Größen liegen für die jeweilige Testsubstanz jedoch häufig nicht vor. Zudem schwankt die tatsächliche Freisetzung durch die komplexen Verhältnisse an der Elektroden- spitze und andere Faktoren erheblich von Elektrode zu Elektrode und von Substanz zu Substanz. Bei in vivo Experimenten wird die Vorausberechnung der Freisetzungsraten durch die Struktur des Nervengewebes weiter erschwert. So kann die Elektrode beispielsweise durch neuronale oder gliale Elemente verlegt sein. Deshalb sind die hier dargestellten Ergebnisse über Substanzfreisetzung aus Elektroden in vitro Orientierungswerte und erlauben nur eine begrenzte Aussage über die absoluten Konzentrationen, die an der Nervenzelloberfläche erreicht werden.

TABELLE 1

SUBSTANZEN	MARKIERUNG	SPEZ. AKTIVITÄT (mCi/mM)	V _K Octanol	P _K	HERKUNFT
<u>1. Tertiäre Amine</u>					
Chlorpromazin	³⁵ S	15.8	1172.1 ± 64.0	9.3	RCA
Levallorphan	³ H	19.5	198.8 ± 3.4		HOFFMANN LA ROCHE
Imipramin	¹⁴ C	17.0	155.6 ± 15.6		RCA
Haloperidol	³ H	90 - 95	374.1 ± 11.7		JANSSEN
ATROPIN	³ H	245.0	0.065 ± 0.004		RCA
LSD	³ H				SANDOZ
<u>2. Quarternäre Substanzen</u>					
Decamethonium	³ H	40.0		9.85	NEN
Curare	¹⁴ C	11.0		3.37/7.83	NEN
<u>3. Aminosäuren</u>					
Glycin	³ H	100.0		2.30/9.91	NEN
GABA	³ H	2000.0		4.03/10.55	NEN
Leucin	³ H			3.75/8.35	NEN

RCA = Radiochemical Center, Amersham, England

NEN = New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA

In der vorliegenden Arbeit wurden in vitro Freisetzungsraten von Substanzen ermittelt, die bei in vivo Experimenten verwendet werden. Bei einem großen Teil der Versuche wurde die Bedeutung verschiedener Parameter für die Freisetzungsraten untersucht, so z.B. der Einfluß von Substanzkonzentration, pH der Substanzlösung, Spitzendurchmesser und Widerstand der Elektrode, Dauer der Aufbewahrung und physiko-chemische Eigenschaften der Substanz.

METHODIK

A) Substanzen (Tabelle 1)

Die radioaktiv markierten Substanzen wurden meist in gelöster Form bezogen. Durch Verdünnung mit Aqua dest. oder Einengen wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt. Die pH-Werte wurden durch Titration mit 0,1 M NaOH bzw. HCl eingestellt (in einigen Fällen mit Puffer). Die verwendeten Substanzen lassen sich chemisch in drei Gruppen einteilen:

1. Tertiäre Amine
2. Quarternäre Substanzen
3. Aminosäuren

B) Elektroden

Es wurde mit zwei verschiedenen Elektrodentypen gearbeitet:

1. Mehrfachelektroden (HERZ et al., 1965).

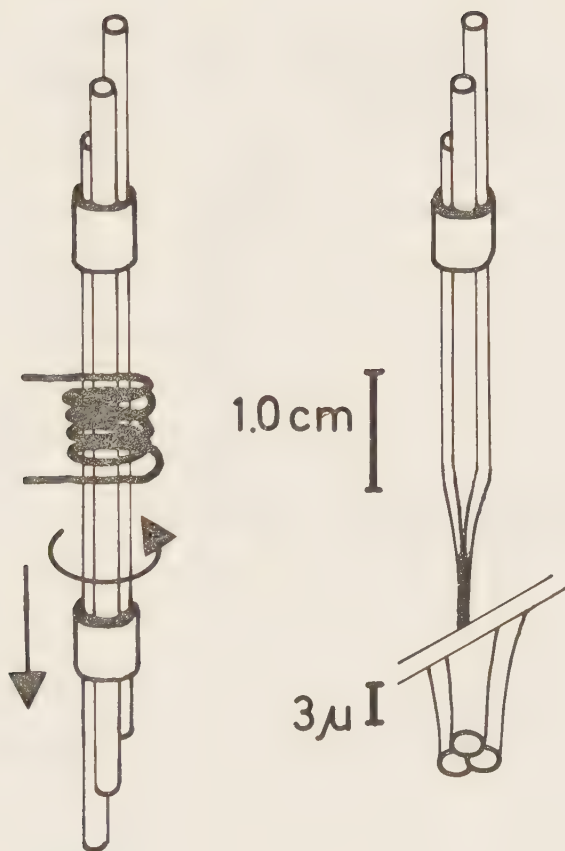


Abb. 1a Schematische Darstellung des Ziehens von Mehrfach-
elektroden. Links: Elektrodenblank mit Heizspirale.
Die beiden Pfeile geben Dreh-, bzw. Zugrichtung an.
Rechts oben: gezogene Elektrode. Rechts unten:
Elektrodenspitze in vergrößertem Maßstab.

Wegen der zu ihrer Füllung erforderlichen, relativ großen Lösungs- menge wurden diese nur bei Substanzen verwendet, von denen eine ausreichende Menge zur Verfügung stand oder die wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit nur bei niedrigen Konzentrationen untersucht werden konnten.

Die Elektroden wurden aus Pyrexglas (Plowden & Thompson, Stouridge, England) in einem Elektrodenziehgerät (nach WINSBURY) hergestellt. Nach dem Ziehen wurden sie etwa 40 Minuten in Aqua dest. gekocht. Die Elektroden füllten sich dabei vollständig mit Aqua dest.. Nach dem Abkühlen wurde das destillierte Wasser bis auf einen kleinen Teil in der Spitze der Elektrode aus den Kanälen abgesaugt und durch Kochsalzlösung (2 M, pH 5.0) bzw. durch die jeweilige Testsubstanz ersetzt. Die Elektroden wurden dann senkrecht hängend bei Zimmertemperatur aufbewahrt, wobei die Elektroden- spitze in Aqua dest. tauchte. In der Regel wurden die Elektroden 24 Stunden nach dem Füllen benützt. Diese Zeit ist erfahrungsgemäß notwendig, um eine vollständige Diffusion durch den in der Spitze verbleibenden Rest an Aqua dest. sicherzustellen. In den meisten Fällen wurde die Spitze unmittelbar vor dem Versuch unter mikroskopischer Sicht mit einer Diamantcarborundscheibe auf einen Durchmesser von 4-6 μ (Bereich 3-12 μ) abgebrochen (Abb. 1a).

2. Einzelelektroden

Da die meisten Lösungen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung standen, wurde häufig mit Einzelelektroden gearbeitet, die es erlaubten, mit 1-2 μ l Elektrodenfüll-

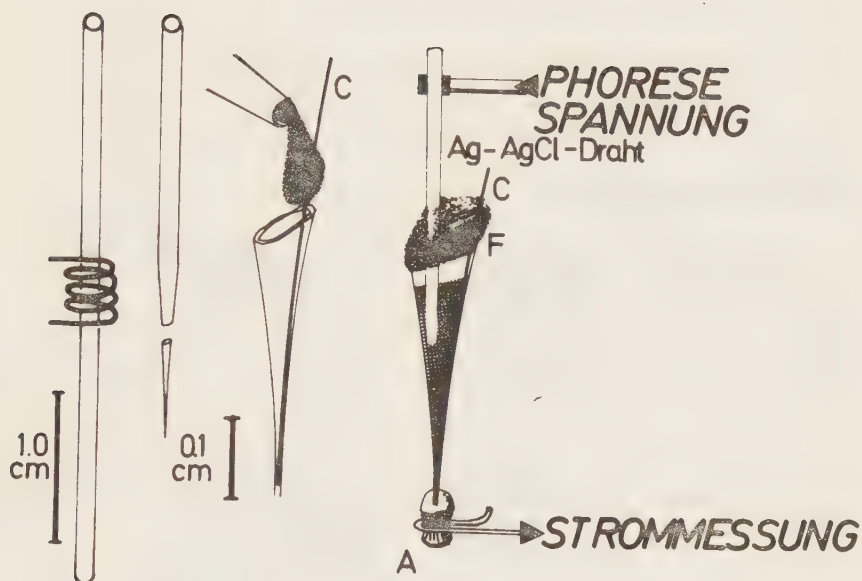


Abb.1 b Schematische Darstellung des Ziehens von Einzel-
elektroden. In der Mitte: Füllen der abgebrochenen
Elektroden spitze vom Schaft her.
Rechts: Anordnung bei der Messung
C = Glaswollhaar
F = Überschuß mit Einkomponentenkleber
A = Auffangkäppchen

menge auszukommen.

Abbildung 1b zeigt das Herstellungsverfahren. Mit Hilfe des Elektrodenziehgerätes wurden Einzelelektroden hergestellt, die Spitze auf 1 - 2 u abgebrochen, dann der Schaft ca. 3 mm oberhalb der Spitze abgebrochen. Von rückwärts wurde eine Glasfaser in die Spitze eingeführt und ein Tropfen der Substanzlösung mit Hilfe einer Mikropipette zwischen Schaft und Glasfaser aufgebracht. Durch kapillare Kräfte füllte sich die Elektrode dann innerhalb weniger Sekunden bis zur Spitze. Ein feiner Silberdraht wurde vom Schaft her in die Substanzlösung eingeführt und mit einem Einkomponentenkleber am Elektrodenschaft befestigt. Diese Elektroden wurden unmittelbar nach dem Füllen verwendet.

C) Allgemeine Methodik

Bei der Mikroelektrophorese werden in der Regel Ionen transportiert, daher auch das Synonym Iontophorese (CURTIS, 1964; KRNJEVIĆ, 1970; STEINER, 1971). Die Ionen folgen dabei einem Potentialgradienten innerhalb der Lösung. Die Verhältnisse beim Stromdurchgang werden durch elektroosmotische Effekte kompliziert. Freisetzung durch Elektroosmose tritt besonders bei sehr verdünnten und schlecht ionisierten Lösungen auf und kann unter Umständen mit der mikroelektrophoretischen Applikation interferieren.

Wird die Pipette gegenüber dem äußeren Medium positiv aufgeladen, so fließt ein Strom, der Kationen aus der Elektrode freisetzt: Man spricht von kationischem Phoresestrom.

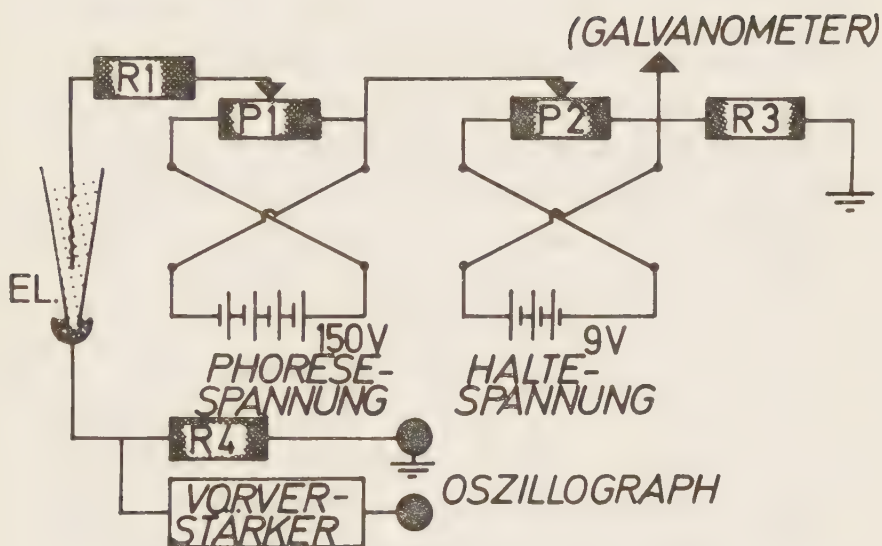


Abb. 2: Schematische Darstellung des Phoresestromkreises

R = Widerstand

P = Potentiometer

Entsprechend wird ein Anionen freisetzender Strom als anionischer Strom bezeichnet.

Bei in vivo Experimenten wird zur Verhinderung spontaner Freisetzung aktiver Ionen durch Diffusion in den Applikationspausen ein Potential umgekehrter Polarität angelegt, der sog. Haltestrom (siehe auch DISKUSSION).

Der verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Über einen Silberdraht (chloriert) werden an die Substanzlösung in der Elektrode steigende Spannungen angelegt. Der Stabilisierungswiderstand des Phoresestromkreises betrug dabei $50 \text{ M}\Omega$. Der Stromfluß durch die Elektrode wurde über einen $20 \text{ K}\Omega$ -Widerstand oszillographisch gemessen. Außer in den speziell erwähnten Fällen wurde ein standardisierter Testablauf eingehalten: Es wurde mit der Applikation von 20 bzw. 50 nA begonnen. Die Stromstärke wurde bei jeder neuen Messung gegenüber der vorhergehenden verdoppelt. Die maximale Stromstärke betrug meist 400 nA. Spontanfreisetzung, d.h. Substanzaustritt ohne Stromapplikation wurde vor und nach der Applikation in mehreren als "Spülwert" bezeichneten Messungen erfaßt. Der Elektrodenwiderstand wurde mit der Wheatstone'schen Brücke vor Versuchsbeginn und nach der Schlußspülung bestimmt, bei den Mehrfachelektroden auch während der Substanzapplikation. Die freigesetzte Substanz wurde in einem Tropfen von etwa 30 μl physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen, der sich in einem Nöpfchen (Luftgewürkugel) befand. Bei besonderen Fragestellungen wurden auch Gemische von Kochsalz-Methanol (1:3), Kochsalz-Cellusolve (1:7) oder Kochsalz-Äthylenglykol (1:7) verwendet. Unter Standardbedingungen floß der Strom für

jeweils 2 Minuten, dann wurde das Näpfchen mit der Auffangflüssigkeit und der freigesetzten Substanz in ein Szintillationszählgefäß gekippt, das mit 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit (BRAY'sche Lösung) gefüllt war. Die freigesetzte Substanzmenge wurde durch Szintillationsmessung in einem Beckmann LS 50 bestimmt. Die background-Aktivität wurde abgezogen. Wenn im weiteren von Standardbedingungen gesprochen wird, so ist damit ein Versuchsablauf gemeint, der dem hier skizzierten Verlauf entspricht.

Für jede Substanz wurde eine Eichkurve (Verdünnungsreihe) erstellt. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der Ausgangslösungen verwendet, deren Aktivität etwa im gleichen Bereich lag, wie die Aktivität der freigesetzten Substanz (1/10, 1/100, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/6000, 1/10 000, 1/20 000, 1/30 000, 1/100 000). Damit war man bei der Auswertung unabhängig von Angaben über die spezifische Aktivität der jeweiligen Substanz.

Der Quotient aus der theoretisch nach dem FARADAY'schen Gesetz zu errechnenden gesamten Ionenfreisetzung und der tatsächlich gemessenen Freisetzung aktiver Ionen ist die Transportzahl (T_n).

$$T_n = \frac{\text{Menge aktiver Ionen}}{\text{Menge freigesetzter Ionen}}$$

ERGEBNISSE

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen zunächst die mit tertiären Aminen und quaternären Ammoniumbasen erzielten Ergebnisse abgehandelt werden. Wegen der teilweise unterschiedlichen Problematik der Versuche mit Aminosäuren werden diese getrennt behandelt (Teil II). Nur an einzelnen Stellen wird schon in Teil I auf Befunde verwiesen, die mit Aminosäuren erhoben wurden.

TEIL I: Tertiäre Amine und quaternäre Ammoniumbasen

Erwartungsgemäß wurden bei steigenden Phoreseströmen auch steigende Substanzmengen freigesetzt. Im Bereich von 50 bis 400 nA wurde in der Regel ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Strom und Freisetzungsrate gefunden. Der unmittelbar nach der Anfangsspülung gewonnene erste Phoresewert war meist niedriger als sich aus einer Extrapolation aus dem Bereich des linearen Kurvenverlaufs ergeben hätte (siehe DISKUSSION). Bei Stromstärken über 400 nA flachte die Kurve oftmals deutlich ab. Als Grund hierfür dürfte der bei hohen Spannungen auftretende Kriechstrom in Betracht kommen. Diese Kriechströme erhöhten sich deutlich bei großer Luftfeuchtigkeit (Anhauchen). Für die Berechnung der Transportzahl sind diese Abweichungen ohne nennenswerte Bedeutung, da hierfür regelmäßig der bei 100 nA gewonnene Wert verwendet wurde. Die folgende Tabelle (Tab. 2) gibt eine Zusammenfassung der für die tertiären Amine und quaternären Ammoniumbasen in verschiedenen Konzentrationsbereichen ermittelten Transportzahlen unter Standardbedingungen. Die jeweils verwendeten Konzentrationen waren

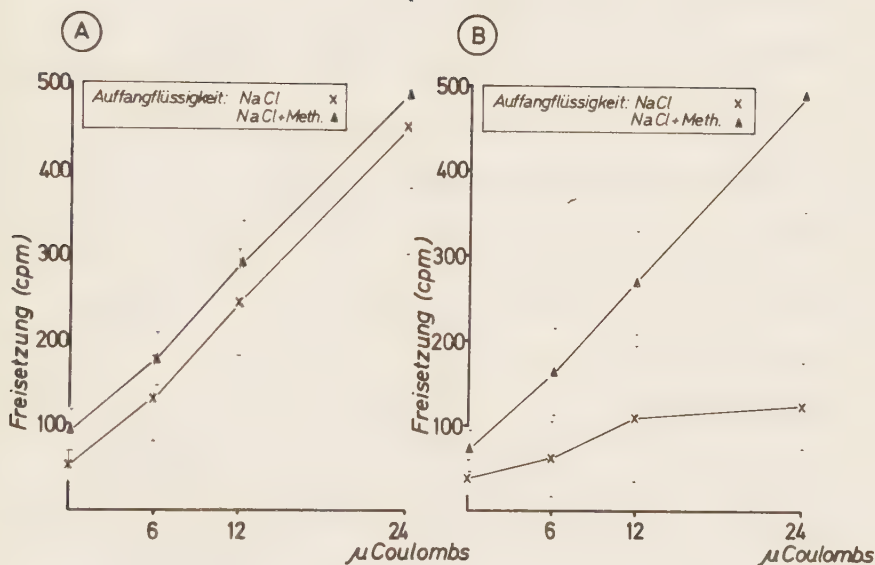


Abb. 3 Freisetzung von Chlorpromazin (spez. Aktivität:
15.8 m Ci/mM, pH = 4.2, $2 \times 10^{-2}\text{M}$)

A = Unter Standardbedingungen

b = Alterungseffekt

Verglichen ist die Freisetzung bei den Auffangmedien
NaCl, bzw. NaCl-Methanol

Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils

20 (A) bzw. (B) Versuchsdurchgängen

bedingt durch die zur Verfügung stehende Substanzmenge und die Löslichkeit der Substanz. Die Tabelle zeigt, daß offenbar in einem gewissen Bereich die Konzentration der Substanzlösung von Bedeutung ist (Curare). Während sich die Freisetzungsraten bei Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-1} M weitgehend entsprechen, sind sie bei niedrigeren Konzentrationen kleiner. Vergleichbare Freisetzungsraten, die mit beiden beschriebenen Elektrodentypen bestimmt wurden, zeigen keine Unterschiede. Das Auffangmedium (NaCl oder NaCl-Methanol) bleibt unter Standardbedingungen ohne wesentlichen Einfluß. Daher wurden die Werte der Tabelle 2, die in diesen beiden Auffangmedien gemessen wurden, nicht getrennt wiedergegeben.

Im folgenden sollen Untersuchungen zu speziellen Problemen dargestellt werden:

1) Alterungseffekt (Bedeutung der Zeitspanne vom Abbrechen der Elektroden spitze bis zur Verwendung der Elektrode).

Um zu klären, welche Bedeutung der Zeitspanne zwischen dem Abbrechen der Elektroden spitze und der Verwendung der Elektrode zukommt, wurde mit "gealterten" Elektroden gearbeitet. Darunter werden bereits verwendete und gebrochene Elektroden verstanden, die, mit den Spitzen in Aqua dest. eintauchend, unterschiedlich lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren. Vor ihrem Gebrauch wurden die Spitzen nicht erneut gebrochen.

Abbildung 3 a zeigt die Freisetzung von Chlorpromazin unter Standardbedingungen. Wie oben schon erwähnt, ist ein nennenswerter Einfluß des Aufnahmemediums nicht erkennbar.

Wurden die Elektroden jedoch erst 7 Tage nach dem Anschleifen wiederverwendet (Abb. 3 b), dann war die Freisetzung bei Versuchen mit NaCl als Auffangmedium stark reduziert. Bei Kochsalz-Methanol als Auffangmedium dagegen erreichten die Freisetzungsraten Werte wie unter Standardbedingungen. Entsprechende Versuche wurden mit allen tertiären Aminen und quarternären Ammoniumbasen durchgeführt. Es zeigte sich dabei, daß kein Unterschied zwischen Substanzen besteht, die bei physiologischem pH als hydrophil bzw. lipophil bezeichnet werden. Dagegen fand sich regelmäßig eine deutliche Abhängigkeit dieses Befundes von der Zeitspanne zwischen Abbrechen der Spitze und dem Versuch. Der Alterungseffekt war bei dreitägigem Stehen kaum, bei mehr als sechstägigem Stehen aber regelmäßig nachweisbar. In der Zeit dazwischen waren die Ergebnisse uneinheitlich.

Die Vermutung, daß während des Stehens eingedrungene Fremdionen für die verringerte Freisetzung verantwortlich seien, bestätigte sich nicht. Wurde nämlich als Auffangflüssigkeit NaCl-Methanol (1:3) bzw. Lösungsvermittler (NaCl-Äthylenglykol (1:7), NaCl-Cellusolve (1:7)) verwendet, so ergab sich in der Regel wieder eine Freisetzung, die Werten bei Standardbedingungen entsprach.

Als Ursache für den Alterungseffekt dürften also nur Veränderungen in Frage kommen, die mit Methanol oder Lösungsvermittler aufhebbar sind: Die Art des Aufnahme-mediums beeinflusst die Freisetzung bei gealterten Elektroden entscheidend, was unter Standardbedingungen nicht der Fall ist (siehe auch später unter Spontanfreisetzung).

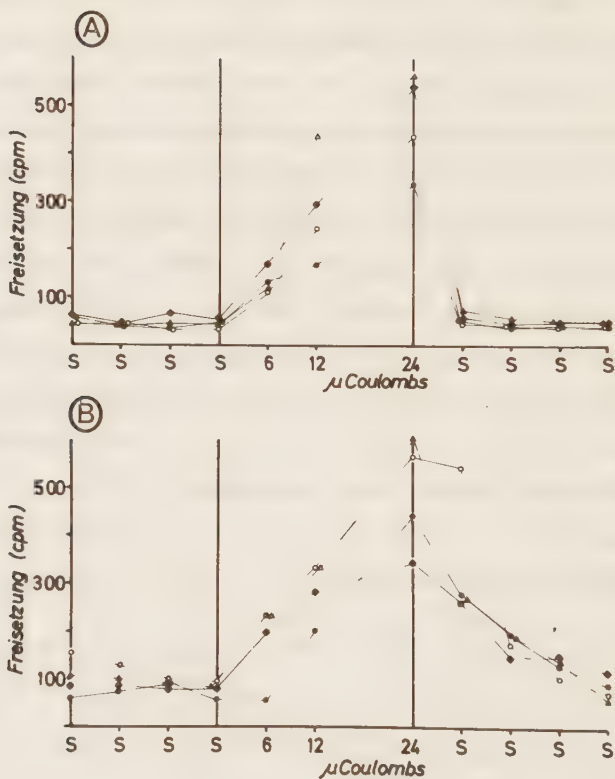


Abb. 4: Freisetzung von Curare (oben) und Chlorpromazin (unten), vor, während und nach der Phorese
S = Spülwerte

Curare: Spezifische Aktivität 11 mCi/mM, pH 4,5, 2×10^{-2} M. Chlorpromazin: Spezifische Aktivität 15.8 mCi/mM, pH = 4.2, 2×10^{-2} M. Wiedergegeben sind jeweils 4 Einzelversuche

Wie schon ausgeführt, wurden die Elektroden unter Standardbedingungen etwa 24 Stunden nach der Füllung verwendet und unmittelbar vor dem Versuch angeschliffen. Vereinzelt wurden diese Intervalle zwischen Füllung und Gebrauch der Elektrode erheblich überschritten, bei einigen Versuchen bis zu 8 Tagen. Die Freisetzung der Substanz wurde dadurch nicht erkennbar beeinflusst. Offenbar können gefüllte Elektroden mindestens 1 Woche lagern, ohne daß dadurch eine Veränderung der Substanzfreisetzung auftritt.

2) Spontanfreisetzung

a) Anfangsspülungen

Die Werte der Anfangsspülungen betrugen bei den meisten Substanzen etwa 7.5 % der bei 100 nA erzielten Freisetzung. Nur bei Chlorpromazin und Levallorphan lagen die Werte höher (um 20 %). Auffangflüssigkeit und Elektrodenart waren ohne erkennbaren Einfluß.

b) Zwischen- und Schlußspülungen

Bei den Spülwerten nach der Applikation von Phoresestrom wurden Merkmale deutlich, die für die jeweilige Substanzgruppe charakteristisch sind (Abb. 4).

Abb. 4 a zeigt 4 Versuchsreihen mit Curare. Als Auffangflüssigkeit diente Kochsalz-Methanol (1:3). Nach der Anfangsspülung folgte Phorese bis 200 nA ansteigend, schließlich die Schlußspülung. Deren Werte sind gegenüber den Anfangsspülwerten nicht erhöht.

Die Spontanfreisetzung ist auch unmittelbar nach Phorese nicht vergrößert. Ähnliche Befunde wurden bei Decamethonium erhoben. Hier liegen die Werte bei Spülungen nach durchge-

führter Phorese zunächst etwa 50% höher als bei Anfangsspülungen, sinken aber bei einem zweiten Spülwert auf deren Niveau.

Die Spontanfreisetzung nach Phorese war bei den anderen untersuchten Substanzen wesentlich stärker und länger erhöht (Chlorpromazin, Levallorphan, Atropin, Haloperidol und mit geringerer Deutlichkeit bei den Aminosäuren GABA, Glycin und Leucin).

Abb. 4 b zeigt den entsprechenden Versuchsablauf für Chlorpromazin. Dargestellt sind Kurvenverläufe von Untersuchungen, bei denen NaCl als Auffangmedium diente. Die Erhöhung der Schlußspülwerte (hier 50 bis 100 % über den Anfangsspülungen) wurde in Kochsalz-Methanol noch deutlicher (100 - 200 %).

Erst nach mehreren Spülungen (4 x 2 Minuten) sinken die Werte wieder auf das Niveau der Anfangsspülung. Dies konnte bei allen Substanzen mit erhöhten Schlußspülwerten beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nahe, daß eine verzögerte Ablösung der freigesetzten Substanz von der Elektroden spitze eine Rolle spielt (siehe DISKUSSION). Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Spüldauer und Spülwert konnte nicht regelmäßig beobachtet werden. Systematische Untersuchungen liegen nur von Chlorpromazin vor. Mit zunehmender Spüldauer steigt erwartungsgemäß der Spülwert an, doch läßt sich kein linearer Zusammenhang erkennen.

c) Spontane Freisetzung bei gealterten Elektroden

Es wurde schon beschrieben, daß der Alterungseffekt durch NaCl-Methanol oder Lösungsvermittler als Auffangflüssigkeit

häufig rückgängig gemacht werden kann. Als wahrscheinliche Ursache dafür wurden physikalische Veränderungen angesehen, die durch Methanol und Lösungsvermittler aufhebbar sind. Für diese Vermutung sprechen erhöhte Anfangsspülwerte bei Versuchen, in denen mit den oben angegebenen Auffangflüssigkeiten der Alterungseffekt zu beseitigen war. Dies war besonders deutlich bei Levallorphan der Fall.

3. Haltestrom

Bei in vivo Experimenten kann die spontane Freisetzung durch Diffusion aus der Elektrode zu Veränderungen der Nervenzellaktivität führen, besonders wenn die Elektrode mit Lösungen höherer Konzentrationen gefüllt ist. Um diese Freisetzung zu verhindern, legt man in den Applikationspausen meist einen sog. Haltestrom an (siehe METHODIK). Es ist zu erwarten, daß dieser Strom Ionen aus dem Nervengewebe in die Elektrode transportiert und damit die ionale Zusammensetzung in der Elektrodenspitze verändert. Dies ist vor allen Dingen der Fall, wenn die Applikationsintervalle zwischen den Substanzapplikationen sehr lang sind. In Versuchen mit Atropin, Curare und Glycin wurden Spülwerte mit (meist 20 nA) und ohne Haltestrom verglichen. Eine signifikante Verminderung der Freisetzung durch den Haltestrom konnte hierbei nicht beobachtet werden. Bei der Mittelwertsberechnung entsprechen sich Spülwert und backing-Wert (48 Versuche).

Dagegen konnte die Wirkung des Haltestroms in anderer Hinsicht deutlich gemacht werden. Bei einer Versuchsreihe mit Atropin wurde untersucht, in wieweit der Haltestrom ^{eine} nachfolgende

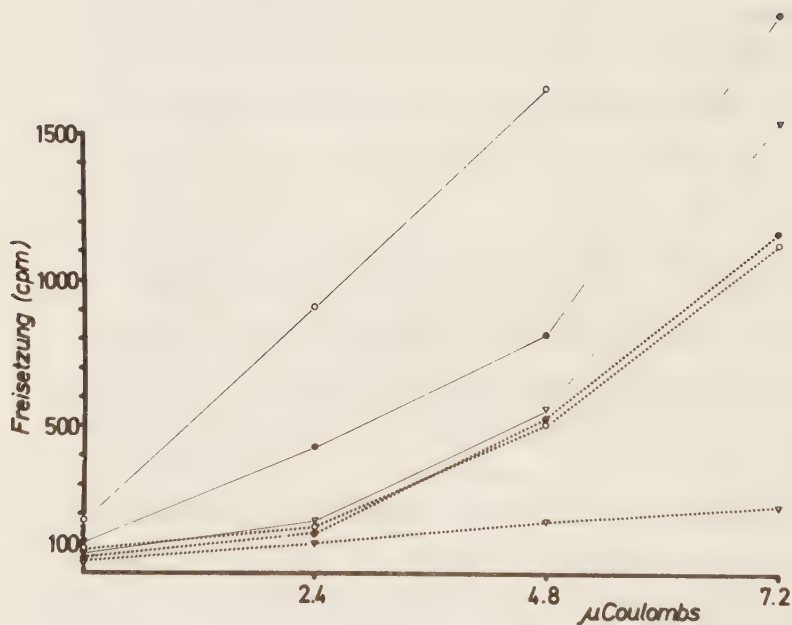


Abb. 5 Freisetzung von Atropin in Abhängigkeit von voraus-
gegangener Haltestrom-Applikation.

Atropin: Spezifische Aktivität = 245 mCi/mM, pH =
 $3.75 \cdot 10^{-2}$ M. Durchgezogene Linien: Standardbedingungen;
 gestrichelte Linien: Applikation von Haltestrom (100 uA
 x 2Min.) vor der Phorese.

Phorese beeinflusst (Abb. 5).

In 6 Einzelverläufen sind Dosenwirkungskurven dargestellt, die auf die übliche Weise gewonnen wurden. Die Hälfte der Fälle entspricht den Standardbedingungen (durchgezogene Linie). Bei 3 anderen Elektroden wurden zunächst Halteströme von 100 nA für 2 Minuten appliziert und danach Phorese durchgeführt. Bei diesem Versuchsablauf war ein verminderter Transport gegenüber Elektroden zu verzeichnen, bei denen mit Phorese begonnen wurde.

4. Gegenstrom

Bei in vivo Experimenten kommt es oft zu einer Polarisationswirkung des Phoresestroms auf die Nervenzelle. Dabei führen kationische Ströme vorwiegend zur Hemmung, anionische Ströme zur Aktivierung der Nervenzelle. Um solche Stromeffekte auszuschließen, wird der Phoresestrom kompensiert, d.h., durch ein benachbartes kochsalzgefülltes Röhrchen wird Strom der gleichen Stärke, aber umgekehrter Polarität appliziert. Durch diese Maßnahme wird das elektrische Feld, das sich durch den Phoresestrom im Gewebe aufbaut, neutralisiert.

Gegenstromversuche wurden mit Atropin, Curare, Imipramin, Haloperidol und Glycin durchgeführt. Der Vergleich der Meßreihen ergab oftmals nur für die einzelne Elektrode eine Tendenz zu vermindertem Transport bei Anlegen des Gegenstroms. Mittelwertsberechnungen zeigten jedoch keine signifikante Differenz.

TABELLE 2

SUBSTANZ	pH	KONZENTRATION M	KONZENTRATIONSBEREICH		
			10^{-3} - 10^{-2}	10^{-2} - 10^{-1}	10^{-1}
Chlorpromazin	4.2	$2 \cdot 10^{-2}$		0.0858 ± 0.024 (43)	
Imipramin	4.5	$2 \cdot 10^{-3}$	0.046 ± 0.016 (20)		
Haloperidol	4.2	$6.7 \cdot 10^{-3}$	0.068 ± 0.054 (13)		
Levallorphan	4.4	$1.1 \cdot 10^{-2}$ / $1.1 \cdot 10^{-1}$		0.0737 ± 0.017 (19)	0.087 ± 0.017 (6)
LSD	4.3	$1 \cdot 10^{-3}$	0.0218 ± 0.003 (6)		
Atropin	3.75	$1 \cdot 10^{-2}$ / $2 \cdot 10^{-1}$		0.132 ± 0.067 (20)	$0.116 \pm 0.058^*$ (7)
Decamethonium	4.2	$1 \cdot 10^{-2}$ / $2.5 \cdot 10^{-1}$		0.132 ± 0.0406 (4)	0.137 ± 0.03 (5)
Curare	4.5	$5 \cdot 10^{-3}$ / $2 \cdot 10^{-2}$	0.056 ± 0.014 (3)	0.162 ± 0.045 (7)	$0.138 \pm 0.02^*$ (8)

Mittelwerte und Standardabweichung der Transportzahl radioaktiv markierter Substanzen in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Die Zahlen in Klammern entsprechen der Anzahl von Versuchen, die Werte mit Sternchen wurden mit Einzelelektroden gewonnen.

5. Ohm'sche Widerstände der Phoresekanälchen

Die Widerstandsmessung mit der Wheatstone'schen Brücke wurde im Abschnitt METHODIK beschrieben. Die Ohm'schen Widerstände der mit Substanzlösung gefüllten Kanälchen lagen im Mittel um $60 \text{ M}\Omega$ (Grenzwerte $10 - 100 \text{ M}\Omega$) und waren damit relativ hoch. Sie schwankten während des Versuchs oft erheblich nach beiden Richtungen. Die Mittelwerte der Widerstände zu Beginn und Ende des Versuchs waren ähnlich. Bei Lösungen der selben Substanz mit verschiedener Molarität stieg der Widerstand mit zunehmender Verdünnung. In vergleichbaren Konzentrationsbereichen scheint der Widerstand der Lösungen der tertiären Amine und quarternären Substanzen höher zu sein als bei Aminosäuren.

6. Streuung der Freisetzungsraten

Der Berechnung der mittleren Transportzahl und deren Standardabweichung (siehe Tabelle 2) liegen die aus einer Reihe von Elektroden gleicher Füllung gewonnenen Werte zugrunde. Es scheint eine Beziehung zwischen Standardabweichung und den verwendeten Substanzen zu bestehen. So war z.B. bei Haloperidol die Streuung von Elektrode zu Elektrode besonders groß bei Hexamethonium mit etwa 10 % verhältnismäßig klein. Bei den Aminosäuren ist sie wie auch die Freisetzungsraten stark abhängig vom pH-Wert und im neutralen Bereich besonders groß.

Im folgenden seien noch weitere Faktoren beschrieben, die für die Freisetzung von Substanzen von Bedeutung sein könnten.

1. Vibration

Bei manchen Substanzen, insbesondere bei Chlorpromazin und

Halo-peridol, war der elektrische Widerstand bei Versuchsbeginn oftmals so hoch ($>100\text{ M}\Omega$), daß trotz maximaler Spannung kein deutlicher Stromfluß zu erzielen war. Dementsprechend war die Substanzfreisetzung gegenüber Spülwerten auch nicht erhöht. Durch ein schnelles rhythmisches Klopfen (etwa 3 x in der Sekunde) mit dem Finger an der Elektrodenhalterung konnte der Widerstand gesenkt werden, wodurch meist eine geregelte Freisetzung möglich wurde.

2. Anfangsaktivierung

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit von Elektroden wurde vor dem eigentlichen Versuchsbeginn häufig für 2 Minuten maximaler Strom (500 bis 1000nA) appliziert. Dies bewirkte oftmals eine Verminderung des Widerstandes, die aber zeitweise schon während der ersten Widerstandsmessung vor dem Versuch beobachtet wurde. Es besteht die Möglichkeit, daß der Meßstrom, der bei der Widerstandsmessung durch die Elektrode fließt, zu ähnlichen Erscheinungen führt. Da schwankende Widerstände durch Nachregulieren der Spannung ausgeglichen werden können, sind sie für die Freisetzung nicht von Bedeutung, sieht man von Extremwerten einmal ab. Daher erscheint es sinnvoll, den Begriff Aktivierung in einem anderen Zusammenhang zu verwenden: Wurden mit einer Elektrode mehrere Versuchsdurchgänge in unmittelbarer Reihenfolge durchgeführt, so ergaben sich bei jeweils gleicher Stromstärke zunehmend größere Freisetzungsraten. Dies wurde bei Levallorphan und Chlorpromazin untersucht und ist wohl auf eine gewisse Akkumulation von Ionen an der Elektroden spitze zurückzuführen.

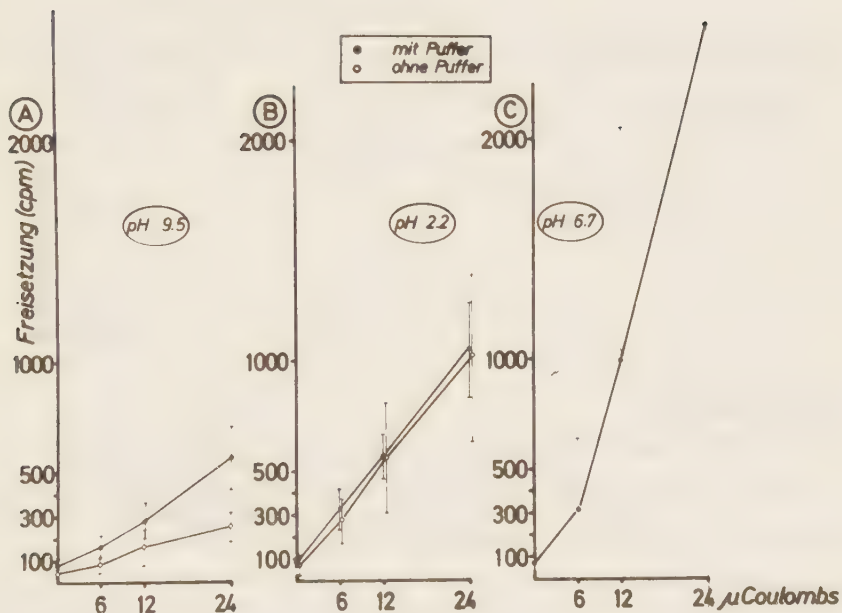


Abb. 6: Freisetzung von Glycin aus ungepufferten und gepufferten Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Glycin: Spezifische Aktivität 100 mCi/mM; 0.5 M
 A = pH 9.5; anionischer Strom
 B = pH 3.2; cationischer Strom
 C = pH 6.7; cationischer Strom
 Mittelwerte und Standardabweichungen aus A = 11 Versuchen mit, 6 Versuchen ohne Pufferlösung, B = 10 Versuchen mit, 7 Versuchen ohne Pufferlösung, C = 10 Versuchen mit Pufferlösung

3. Elektrodendurchmesser

Trotz einer relativ großen Streubreite hatte der Elektrodendurchmesser (Grenzwerte 3 - 12 μ bei Multielektroden, 1 - 3 μ bei Einzelelektroden) keinen Einfluß auf die Freisetzungsrates. Nur bei sehr großen Spitzendurchmessern ($> 12 \mu$) waren die Spülwerte deutlich erhöht.

II. Aminosäuren

Diese Stoffgruppe wird wegen der ihr eigenen Problematik getrennt dargestellt. Insbesondere wurde bei diesen Substanzen der Einfluß des pH-Wertes auf den Transport untersucht.

In Abhängigkeit vom pH kommt es zur Ionisation der Carboxyl- oder Aminogruppe. Da nun der Ionisationsgrad von entscheidender Bedeutung für die Freisetzungsrates ist, kann man bei verschiedenen pH-Werten mit deutlichen Veränderungen der Freisetzungsrates rechnen. Bei in vivo Experimenten werden üblicherweise relativ hochmolare Lösungen solcher Aminosäuren verwendet. Aus diesem Grund verwendeten auch wir bei unseren Versuchen 0.5 bzw. 1.0 molare Lösungen. Wegen des hiermit verbundenen großen Substanzbedarfs wurden durchwegs Einzelelektroden mit geringerem Füllungsvolumen benützt.

Abb. 6 zeigt die Freisetzung von Glycin in Abhängigkeit vom pH der Lösung (Mittelwert und Standardabweichung).

In saurem Milieu (pH = 2.2) wird regelmäßig mehr Substanz transportiert als in alkalischem. Bei annähernd neutralen

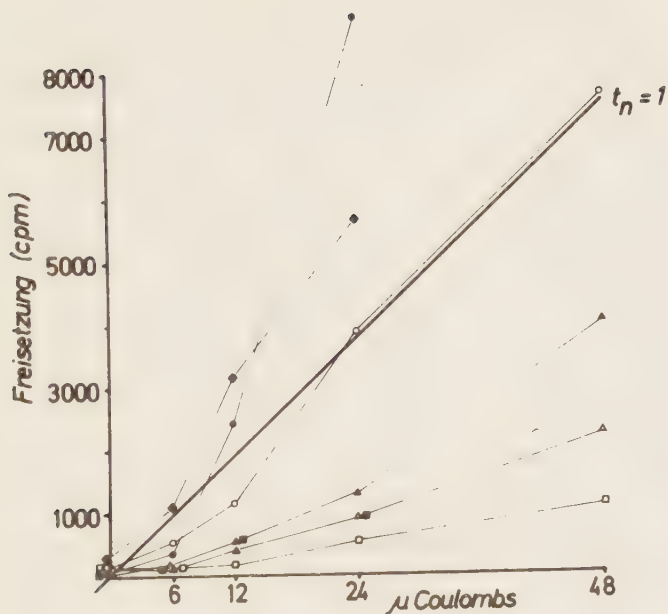


Abb. 7: Freisetzung von Glycin aus gepufferter Lösung (pH = 6.7) bei Applikation von kationischem Strom
 Glycin: Spezifische Aktivität 100 mCi/mM; 0.5 M.
 Dargestellt sind 6 Einzelversuche, die Freisetzung, die einer Transportzahl von 1 entspricht, ist eingezeichnet.

Lösungen (und kationischem Strom) erreicht die Freisetzung in der Regel die höchsten Werte. In diesem Fall wird Glycin vermutlich vorwiegend durch Elektroosmose freigesetzt (siehe Diskussion).

Um dies zu verdeutlichen, wird in Abb. 7 der Verlauf von Einzelkurven der entsprechenden Versuchsreihe mit neutralem Phosphatpuffer gezeigt. In drei Fällen wird dabei mehr Substanz freigesetzt als es einer Transportzahl von 1 entspricht. Bei Glycin ohne Puffer konnte im neutralen Bereich häufig keine geregelte Freisetzung erzielt werden.

Es zeigte sich eine große Streuung und nur in vier von neun Fällen war der Transport einigermaßen linear. Auch bei anderen pH-Werten war die Substanzlösung ohne Puffer vermindert freigesetzt worden.

Eine Abhängigkeit der Freisetzungsraten vom pH-Wert wurde auch bei Versuchen mit GABA und Leucin gefunden (siehe Tab. 3). Bei neutraler Leucinlösung ist die Transportzahl etwa gleich groß wie in saurem Milieu.

Die hohen Freisetzungsraten bei annähernd neutralem pH der Substanzlösung wurden bei Applikation von kationischem Strom beobachtet. Auch bei anionischem Strom wurde Substanz freigesetzt, bei entsprechender Stromstärke jedoch nur etwa $1/20$ wie bei kationischem Strom.

Die Konzentration der Lösung hat bei den Aminosäuren für die Freisetzung die gleiche Bedeutung wie es bei den tertiären Aminen und quarternären Substanzen ausgeführt wurde. Die Werte in Tab. 3 wurden bei 0.5 bis 1 M gemessen. Bei einer Molarität von 10^{-2} schwankte die Transportzahl bei Glycin je nach Versuchsbedingungen (pH) zwischen 0.013 und 0.024.

TABELLE 3

SUBSTANZEN	KONZENTRATION M	pH	cationisch	pH	anionisch	pH	cationisch
Glycin	0.5	2.32	0.281 ± 0.129 (11)	9.65	0.074 ± 0.039 (10)	6.9	$0.152 \pm 0.053^*$ (10)
Glycin in Puffer- lösung	0.5	2.28	0.283 ± 0.47 (6)	9.5	0.132 ± 0.38 (7)	6.7	0.531 ± 0.54 (4)
GABA	0.5	1.4	0.135 ± 0.040 (8)	12.7	0.024 ± 0.011 (14)	5.9	0.695 ± 0.61 (7)
Leucine	1.0	2.55	0.242 ± 0.118 (7)	9.7	0.033 ± 0.007 (6)	5.95	0.231 ± 0.17 (4)

Transportzahl radioaktiv markierter Aminosäuren bei verschiedenen pH-Werten. Die Zahlen in Klammern entsprechen der Anzahl von Versuchen. Bei Glycin und GABA wurden die Versuche teils mit physiologischer Kochsalzlösung, teils mit Kochsalz-Methanol (1:3) als Auffangflüssigkeit durchgeführt. Da signifikante Unterschiede nicht auftraten, sind die Werte hier zusammengefaßt.

*Im neutralen Bereich wurde ^{bei} Glycin ohne Pufferlösung in 5 von 9 Fällen keine geregelte Freisetzung erreicht. Diese sind demzufolge bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt.

Die oben abgehandelten Ergebnisse entsprechen im Trend Befunden von Obata, der für GABA ebenfalls die niedrigsten Freisetzungsraten bei alkalischem pH fand, die höchsten in einem annähernd neutralen Bereich ($t_n = 30$).

DISKUSSION

Die Versuche haben übereinstimmend gezeigt, daß zwischen der Freisetzung von ionisierten Substanzen aus Mikroelektroden und dem Phoresestrom eine lineare Beziehung besteht, sieht man von Bereichen sehr hoher (> 400 nA) oder sehr niedriger (< 20 nA) Stromstärken einmal ab. Dieser lineare Zusammenhang zwischen Freisetzungsrates und Stromfluß läßt sich schon aus dem 2. Faraday'schen Gesetz ableiten. Da die Freisetzung durch die komplexen Verhältnisse an der Elektrodenspitze häufig entscheidend beeinflußt wird, ist eine Vorausberechnung der Transportzahl problematisch (Krnjević, 1963; Curtis, 1964). Die Transportzahl einer Substanz beschreibt die Tatsache, daß beim Stromfluß durch eine Mikroelektrode nur ein bestimmter prozentualer Anteil des Stromes von den Ionen dieser Substanz getragen wird. (Sind dies z.B. 40% der interessierenden Ionenspezies, so beträgt die Transportzahl 0,4). Dieser Anteil hängt von einer großen Anzahl von Faktoren ab, so z.B. von der Beweglichkeit der Ionen. Diese wiederum steht in engem Zusammenhang mit der Molekülgröße, die nicht nur durch die Anzahl der Atome, sondern auch von der Hydratationshülle abhängt (Curtis, 1964; Steiner, 1970). Grenzflächenphänomene, wie sie besonders bei schlecht leitenden und sehr verdünnten Lösungen vorkommen, beeinflussen die Freisetzung oft ganz entscheidend. Sie führen dann zu noch schwerer überschaubaren Vorgängen, die meist unter dem Begriff Elektroosmose zusammengefaßt werden.

Ihr Effekt ist komplementär zu dem der Elektrophorese. Statt geladenen Teilchen bewegen sich hier Lösungsmittelmoleküle gegen eine stationär geladene Oberfläche (Kapillarwand) und reißen dadurch Substanzmoleküle mit. Zwischen beiden Schichten bildet sich ein Potential aus, das für die Geschwindigkeit entscheidend ist, mit der sich die Flüssigkeit bewegt (Adamson, 1960; Davies, 1961; Shaw, 1969). Bei ausreichend ionisierten und konzentrierten Lösungen - wie sie gewöhnlich bei in-vivo Experimenten verwendet werden - spielt diese Art der Freisetzung eine unbedeutende Rolle (Curtis, Perrin, Watkins, 1960; Krnjević, 1963). Die Elektroosmose ist jedoch für die Freisetzung der Aminosäuren wichtig. Verändert man nämlich den pH-Wert einer Lösung, so wird der Ionisationsgrad und damit auch die Freisetzungsrates beeinflusst.

Am Beispiel des Glyzins konnte gezeigt werden, welche Bedeutung in diesem speziellen Fall einem Puffer zukommt, der die Lösung auf einem Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes hält.

Glyzin ist eine sog. neutrale Aminosäure, d.h. sie besitzt eine Amino- und eine Säuregruppe. Demzufolge kann sie sowohl aus alkalischen als auch aus sauren Lösungen mit Strömen entsprechender Polarität freigesetzt werden. Bei pH-Werten in der Nähe des isoelektrischen Punktes ist keine der Gruppen ionisiert und man muß annehmen, daß die Freisetzung dann entscheidend durch die Elektroosmose bestimmt wird. Dies ist

auch dann der Fall, wenn die Transportzahl über 1 liegt, was nur möglich ist, wenn andere Freisetzungsmechanismen ins Spiel kommen als die normale Elektrophorese. Da die Elektrosmose besonders bei nichtionisierten und schwer wasserlöslichen Substanzen wirksam wird, ist sie bei in-vivo Untersuchungen, z.B. von Zuckern und Hormonen, besonders wichtig (Oomura, 1969a).

Eine interessante Möglichkeit für die Technik der Mikroelektrophorese läßt sich aus den Experimenten mit gepufferter Substanzlösung ableiten. Bei allen in-vivo Versuchen ist man bestrebt, eine möglichst gute Ionisation der Substanz zu erreichen. In einigen Fällen muß dabei in sehr sauren pH-Bereichen gearbeitet werden. Da Protonen, ins Nervengewebe appliziert, einen exzitatorischen Effekt haben, ist es möglich, daß Substanzwirkung und pH-Effekt interferieren (Curtis, 1961). Durch die Pufferung der Substanzlösung könnte man in einen physiologischen pH-Bereich kommen, wobei die Substanz dann nur geringfügig ionisiert ist und elektroosmotische Effekte an Bedeutung gewinnen. Bei einer Ausnützung dieser Möglichkeit wäre dann aber eine genaue Bestimmung der Freisetzungsrates für die jeweilige Substanz mit Hilfe der beschriebenen Methode unerlässlich.

Bei Untersuchungen über die Abhängigkeit der Transportzahl von der Substanzkonzentration fand sich in einem bestimmten Bereich ein deutlicher Zusammenhang: höher konzentrierte

Lösungen haben meist eine höhere Freisetzungsrates. Dieser Befund ist aus rein physikalischen Überlegungen zu erwarten. Mit steigender Konzentration von ionisierten Substanzmolekülen steigt die Wahrscheinlichkeit, daß ein solches Ion zum Stromfluß beiträgt und damit freigesetzt wird. Die Frage, ob bei sehr hochkonzentrierten Lösungen die Transportzahl, wie physikalisch zu erwarten (verminderte Ionenbeweglichkeit), wieder abnimmt, konnte mit unseren radioaktiv markierten Substanzen nicht geklärt werden, da uns diese meist nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung standen.

In einer anderen Testserie wurde systematisch die Auswirkung von Haltestrom auf die Freisetzungsrates bestimmt. Dabei konnte keine Rückhaltewirkung auf die spontane Freisetzung durch Diffusion an der Grenzfläche Substanz-Auffangmedium gefunden werden. Zum anderen zeigte sich jedoch, daß bei Applikation von Phoresestrom nach Haltestrom die Freisetzungsrates vermindert sind. Bei in-vivo Untersuchungen dürfte diese Veränderung eine Rolle spielen. Oft vergehen Minuten und Stunden, bis wieder ein neues Neuron gefunden wird. In der Zwischenzeit „saugt“ die Elektrode nicht nur die aktiven Ionen in die Spitze zurück, sondern gleichzeitig auch Fremdionen aus dem Gewebe. Diese Kontamination führt dann zu einer veränderten Freisetzung bei den nachfolgenden Applikationen von Phoresestrom. Daher muß abgewogen werden, ob die Verwendung von Haltestrom sich empfiehlt, zumal ein Zurückhalteeffekt nicht nachweisbar ist.

Bei einer großen Anzahl von Versuchen machten wir die Beobachtung, daß bei Elektroden, deren angebrochene Spitze längere Zeit in Aqua dest. ragte, die Freisetzung deutlich vermindert wurde. Wir erklärten uns dieses Verhalten damit, daß durch osmotische Kräfte Aqua dest. in die mehr oder weniger konzentrierte Substanzlösung eingedrungen ist und damit zu einer Verdünnung im Spitzenbereich der Elektrode geführt hat. Es liegt also bei den ersten Meßwerten eine geringer konzentrierte Lösung in der Spitze vor, als bei den nachfolgenden. Auch das Phänomen, das wir als „Aktivierung“ bezeichnet haben (siehe 2, Ergebnisse), dürfte darauf zurückzuführen sein, daß nach der oben beschriebenen elektro-osmotisch bedingten Flüssigkeitsverschiebung bei wiederholter Applikation von Phoresestrom die Konzentration im Spitzenbereich wieder ansteigt und damit auch die Freisetzungsrates.

Eine andere Erklärung wird nötig bei Versuchen mit gealterten Elektroden (d.h. bereits abgeschliffene Elektroden, die mehrere Tage mit der Spitze in Aqua dest. hängend gelagert wurden). Die Freisetzung wird hier abhängig vom Aufnahme-medium verschieden stark vermindert, in Kochsalz sehr deutlich, in Kochsalz-Methanol bzw. Lösungsvermittlern kaum. Diese waren sogar in der Lage, den Alterungseffekt häufig aufzuheben.

Erhöhte Anfangsspülwerte in diesen Fällen sind offensichtlich die Folge einer Auflösung physikalisch-chemischer Veränderungen

(z.B. semipermeable Membranen), die den Transport in Kochsalz verhinderten.

Wurden die Elektroden unmittelbar vor Versuch angeschliffen, blieb der Zeitpunkt der Füllung ohne Einfluß auf den Transport (Untersuchungen bis zu 8 Tagen). Die Vermutung, daß die Ursache für den Alterungseffekt in physikalisch-chemischen Veränderungen zu suchen sei, die durch die große Oberfläche der Elektrodenspitze bedingt sind, wird dadurch widerlegt; denn nur bei abgeschliffenen Elektrodenspitzen ist mit dem Auftreten eines Alterungseffektes zu rechnen. Dies wiederum ist zeitabhängig: wurden die Elektroden - wie oben angegeben - gelagert, war eine Reduzierung des Transports in keinem Fall schon nach 3 Tagen feststellbar, nach 6 Tagen jedoch regelmäßig.

Aus den Versuchen, bei denen sog. gealterte Elektroden mit einem geänderten Auffangmedium wieder reaktiviert wurden, geht hervor, daß es sich um eine Veränderung an der Spitze handelt. Es dürften sich dabei Kristallisationen ausbilden, die dann als semipermeable Membran wirken und kleineren Ionen den Vortritt lassen (Krnjević, 1963). Ob bei diesen Kristallisationsvorgängen auch eine Aggregation mit kleinsten Glaspartikeln und evtl. Bakterienkolonien eine Rolle spielen, ist nicht sicher zu entscheiden. Diese sog. Spitzenphänomene sind vor allen Dingen bei Substanzen von außerordentlicher Bedeutung, die durch ihre physiko-chemischen Eigenschaften

(Oberflächenaktivität) zu den sog. lipophilen Substanzen gezählt werden. Dazu gehört auch das Chlorpromazin, dessen physiko-chemische und vielleicht auch pharmakologische Eigenschaften durch eine hohe Oberflächenaktivität seiner Verbindung bestimmt ist (Guth, 1966).

Aus in-vivo Untersuchungen war uns bekannt (Albee-Fessard, Curtis, Herz u.a., 1970), daß diese Substanz häufig Elektroden blockiert, d.h. den Ohm'schen Widerstand der Ableitelektrode und der Applikationselektrode gegen unendlich erhöht. Aus diesen Untersuchungen lag für uns der Schluß nahe, es könnte sich dabei um ein Grenzflächenphänomen an der Elektrodenspitze handeln. Wir vermuteten, daß Chlorpromazin nicht in die Aufangflüssigkeit zu diffundieren vermag und sich deswegen an die Glaswand der Elektrode anlegt. Gestützt wurde dieses durch die Beobachtung, daß durch leichtes Vibrieren der Elektrode die Freisetzung in einigen Fällen normalisiert werden konnte. Durch Ausbildung kleinster Turbulenzen an der Elektrodenspitze kommt es zu einer mechanischen Ablösung des bereits freigesetzten, aber wieder adsorbierten Chlorpromazins. Gleichzeitig wurde damit auch der Elektrodenwiderstand normalisiert.

Wie aus Untersuchungen von Kriegelstein (1973) hervorgeht, ist Chlorpromazin bei pH 5 noch sehr oberflächenaktiv. Es läßt sich vermuten, daß durch die Ladung an einem N-Atom die mikroelektrophoretische Freisetzung bewirkt wird, dann

aber keine Weiterdiffusion im wässrigen Medium möglich ist. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, daß die Freisetzung des Chlorpromazin in NaCl-Methanol als Aufnahme-medium besonders bei gealterten Elektroden erhöht ist. Durch die teilweise Ionisierung des 2. N-Atoms besitzt Chlorpromazin zwei geladene Gruppen was dann zu einer Herabsetzung der Transportzahl führen muß.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die elektrophoretische Freisetzung verschiedener Substanzen aus Mikroelektroden in vitro untersucht und dabei die Bedeutung verschiedener Parameter überprüft. Im Bereich von ca. 50 - 400 nA fand sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Phoresestrom und Freisetzungsrate. Offenbar beeinflußt die Konzentration der Substanzlösung in einem gewissen Bereich die Freisetzung. Während die Freisetzungsraten zwischen 10^{-1} und 10^{-2} M Lösungen sich weitgehend entsprechen, sind sie bei niedrigeren Konzentrationen kleiner.

Die Bedeutung des pH-Wertes wurde bei den Aminosäuren untersucht. Die Freisetzungsraten stiegen bei saurer gegenüber alkalischer Substanzlösung deutlich an und waren im neutralen Bereich am höchsten. Einzelkurvenverläufe entsprachen einer Transportzahl > 1 , was durch Elektroosmose erklärt wird.

Betrug die Zeitspanne vom Abbrechen der Elektroden spitze bis zur Verwendung der Elektrode 7 Tage oder mehr, so war die Freisetzung bei Versuchen mit NaCl als Auffangflüssigkeit deutlich vermindert („Alterungseffekt“), während sie bei den Auffangflüssigkeiten NaCl-Methanol bzw. NaCl-Lösungsvermittler gegenüber Standardbedingungen unverändert blieb.

Die Spontanfreisetzung lag bei 7,5% der mit 100 nA erzielten

Werte (Anfangsspülungen), bei Levallorphan und Chlorpromazin um 20%. Bei vorheriger Applikation von Phoresestrom war die Spontanfreisetzung bei Tertiären Aminen deutlich erhöht und sank erst nach mehreren Spülungen (4×2 min.) wieder auf das Niveau der Anfangsspülungen. Dagegen fand sich bei quaternären Substanzen auch unmittelbar nach Phorese kaum eine Veränderung der Spülwerte.

Eine Verminderung der Spontanfreisetzung durch Haltestrom ($20 \text{ nA} \times 2 \text{ min.}$) wurde nicht beobachtet. Die Wirkung des Haltestroms ($100 \text{ nA} \times 2 \text{ min.}$) konnte in einem anderen Zusammenhang deutlich gemacht werden: Es zeigte sich bei der auf Haltestrom folgenden Phorese ein verminderter Transport gegenüber Elektroden, bei denen die Phorese nach den Anfangsspülungen durchgeführt wurde (Standardbedingungen).

Durch Gegenstrom wurde die mikroelektrophoretische Freisetzung nicht signifikant beeinflusst.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, A.W.: Physical chemistry of surfaces. Interscience
NY (1960)
- Albee-Fessard, D., P.D. Bradley, H.M. Gerschenfeld, A. Herz,
K. Krnjević, Z. Lodin, T.J. Marczynski, J. Massion, M.
Meulders, L.J. Poirier, G. Salmoiraghi, J. Schlag, L.
Talc and P.P. Wall: Neurophysiologie und Neuropharmacologie.
In: The Neuroleptics, Edit. D.P. Bobon, P.A. Janssen,
J. Bobon, S. Karger, Basel (1970)
- Curtis, D.R., J.W. Phillis, J.C. Watkins: Cholinergic and
noncholinergic transmission in the mammalian spinal cord.
J.Physiol (Lond.) 158, 296-323 (1961)
- Curtis, D.R.: Microelectrophoresis. In: Physical techniques
in biological research. Bd. V, hsg. von W.L. Nastuk,
Academic Press, NY, pp 144-190 (1961)
- Davies, J.T., E.Z. Kezeli: Interfacial phenomena. Academic
Press, London (1961)
- Hoffer, B.J., N.H. Neff and Higgins, G.P.: Microiontophoretic
release of norepinephrine from micropipettes. Neuro-
pharmacology 10, 175-180 (1971)
- Krnjević, K.: Micro-iontophoretic studies on cortical neurons.
Intern.Rev. Neurobiology 7, 41-98 (1964)
- Krnjević, K., P. Laverdy and L.F. Sharman: Iontophoretic
release of adrenaline, noradrenaline and 5-hydroxy-
tryptamine from micropipettes. Brit.J.Pharmacol. 20,
491-496 (1963)

- Krnjević, K., J.F. Mitchell, and J.C. Szerb: Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes. *J.Physiol.* 165, 421-436 (1963)
- Leuthardt: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Proteine und ihre Bausteine, p. 66
- Obata, K., K. Takeda, and H. Shinozaki: Electrophoretic release of γ -aminobutyric acid and glutamic acid from micropipettes. *Neuropharmacology* 9, 191-194 (1970)
- Oomura, Y., T. Omo, H. Ooyama and M. Wayner: Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature (Lond.)* 222, 282-284 (1969a)
- Shaw: Electrophoresis. Academic Press, NY (1969)
- Steiner, F.A. (ed.): Neurotransmitter und Mikromodulatoren. Thieme Verl. Stuttgart, p. 6-8 (1970)
- Zieglgänsberger, W., A. Herz., and H. Teschemacher: Electrophoretic release of tritium-labelled glutamic acid from micropipettes in vitro. *Brain Res.* 15, 298-300 (1969)

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. A. Herz für die Überlassung des Themas und für die ständige Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. W. ZIEGLGÄNSBERGER danke ich für seine wertvollen Anregungen zu vielen Problemen und für seine Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Bei allen Mitarbeitern des Labors bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Vorbereitung und Auswertung der Versuche, ganz besonders bei Frau ZIEGLGÄNSBERGER und Fräulein OHLING.

LEBENS LAUF

Am 4. April 1947 wurde ich als Sohn des Apothekers Heinrich Sothmann und seiner Ehefrau Theda geb. Schauenburg, in Biere/Thüringen geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Hilpoltstein/Mfr. die höhere Schule im Staatl. Landschulheim Marquartstein/Obb. wo ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Wintersemester 1966/67 begann ich das Medizinstudium an der Universität München, wo ich es im Herbst 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich an der Chir. Universitätsklinik München und auf der Inneren Abteilung des städt. Krankenhauses Harlaching.

